

11.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 3 5 4 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 4 3 5 4 9]

出 願 人 株式会社資生堂
Applicant(s):

REC'D 02 DEC 2004

WIPO

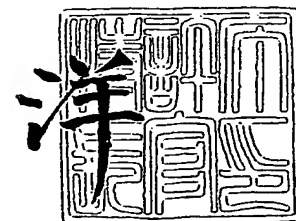
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 1033905
【提出日】 平成15年10月 1日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 A61K 67/00
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 青木 宏文
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区下馬 4-16-5
 【氏名】 児玉 龍彦
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 長谷川 聖高
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（金沢八景）内
 【氏名】 加治屋 健太郎
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（金沢八景）内
 【氏名】 石松 弓子
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区銀座 7-5-5 株式会社資生堂内
 【氏名】 尾郷 正志
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 吉田 誠一
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内
 【氏名】 岸本 治郎
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（金沢八景）内
 【氏名】 茂呂 修
【特許出願人】
 【識別番号】 000001959
 【氏名又は名称】 株式会社資生堂
【代理人】
 【識別番号】 100099759
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 青木 篤
 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敬
【選任した代理人】
【識別番号】 100087413
【弁理士】
【氏名又は名称】 古賀 哲次
【選任した代理人】
【識別番号】 100117019
【弁理士】
【氏名又は名称】 渡辺 陽一
【選任した代理人】
【識別番号】 100082898
【弁理士】
【氏名又は名称】 西山 雅也
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 209382
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0305959

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中のMCP2 (Monocyte Chemoattracting Protein 2: 単球化学誘引タンパク質-2) の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記皮膚しみ形成がUVB照射を原因とする、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記表皮中のMCP2の発現の亢進が、表皮中のMCP2の量を測定することにより決定される、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

前記測定がMCP2に特異的な抗体を利用するELISA法又はRIA法による、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記表皮中のMCP2の発現の亢進が、表皮から抽出されたMCP2をコードするmRNAの量を測定することにより決定される、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

前記mRNAの測定をポリメラーゼ連鎖反応法により行う、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物をMCP2の発現及び／又は活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するMCP2インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

【請求項 8】

更に、前記阻害能力を有するMCP2インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (ヒトFLJ21763遺伝子) もしくは当該ポリヌクレオチドに対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、表皮中の配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (マウスAK012157遺伝子) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、又は表皮中の配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (ラットS74257遺伝子) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

【請求項 10】

前記皮膚しみ形成がUVB照射を原因とする、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

前記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進が、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される、請求項9又は10記載の方法。

【請求項 12】

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (ヒトFLJ21763遺伝子) もしくは当該ポリヌクレオチドに対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、表皮中の配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (マウスAK012157遺伝子) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、又は表皮中の配列番号3に示す

塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラット S74257 遺伝子）に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

【請求項 13】

更に、前記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項 12 記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 しみ部位亢進遺伝子群を指標とした皮膚しみ形成予知方法、皮膚しみ形成抑制剤のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

紫外線やホルモンのアンバランス、精神的ストレスなどによりメラノサイト（色素形成細胞）内の酵素チロシナーゼの働きが異常に活性化されると、メラニン色素が次々とつくりだされて周辺の表皮細胞に送られてしまう。メラニン色素のつくりだされるペースが速く、また紫外線等の影響でターンオーバーが正常でなくなると、メラニン色素が外へ排出されず、肌に残ってしまい、その結果肌にしみができてしまうものと考えられる。

【0003】

しみができてしまったら、できるだけ早くその手入れをすることが好ましく、そのために美容技術者による視感（視覚）によるしみの官能評価や、皮膚状態の撮像装置、測色計等の機器を用いるしみの定量的評価により、しみの有無の早期判定が望まれる（特開2003-144393号公報）。

【0004】

一旦しみができてしまうと、その除去は容易ではなく、肌の新陳代謝を良くして不要なメラニンを早く追い出し、余計なメラニンを作らないようにするなどの手入れが必要となる。従って、しみができる前に肌の手入れを行うことが好ましい。しかしながら、しみのでき易さには個体差があり、またその原因となる条件も様々であるため、しみができることを予知することは一般に困難である。よって、しみができる前にしみができ易い状態であるか否かを予知できる手段があればしみ予防対策として極めて有効である。

【非特許文献1】 M. Naganuma et al., Journal of Dermatological Science 25(2001) 29-35

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】**

【0005】

本発明者は上記問題を鑑み、肌にしみができる前に肌がしみのでき易い状態であるか否かを予知できる手段を提供できるかを鋭意検討した。そして、本発明者は紫外線照射を施したのち照射をやめて日焼け様呈色が脱色した後、しばらくして老人性色素斑様のスポット状色素斑を形成するしみモデルマウス（M. Naganuma et al., Journal of Dermatological Science 25(2001) 29-35）のしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮においてAK012157遺伝子（配列番号1）及びMCP-2（Monocyte Chemoattracting Protein 2:単球化学誘引タンパク質-2）遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。従って、ヒトの表皮において、AK012157遺伝子と相同なヒト遺伝子であるFLJ21763遺伝子（配列番号2）及びMCP-2遺伝子の発現を調べることで、しみ形成し易い皮膚であると判断することが可能であることが明らかとなった。

【0006】

マウスAK012157遺伝子は遺伝子の塩基配列のみ既知であり、機能に関する報告はされていない遺伝子である（Meth. Enzymol. 303, 19-44 (1999)）。ラットにおいてこの遺伝子と約80%相同な遺伝子（S74257;配列番号3）が癌の浸潤・転移に関係しているという報告は存在するが（Oncogene, 1994, 9 (12), 3591-3600）、この遺伝子についても皮膚色素関連の報告は存在しない。さらに、ヒトにおいてマウスAK012157遺伝子と約70%相同な遺伝子（ヒトFLJ21763遺伝子）の存在が知られているが、この遺伝子についても皮膚色素関連の報告は存在しない。また、MCP-2はケモカイン（分子量約1万の小型のサイトカインファミリー）の一種であり、そのファミリーのMC

P-1では単球の誘引を介して非腫瘍形成性のメラノーマ細胞を腫瘍形成させるという報告はあるが(Journal Immunol. Jun 1; 166(11):6483-6490)、皮膚色素関連の報告は存在しない。

【0007】

従って、しみとの関係でこれら遺伝子の発現が亢進されることは極めて驚くべき事実である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

第一の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMCP2の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする。ここで、しみとは、皮膚に現われる茶褐色ないし濃褐色の平面状斑紋をいう(広辞苑)。なかでも今回のシミモデルマウスについて表記するしみは、主に老人性色素斑様の色素斑をさす。

好適な態様において、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とするものである。

さらに好適な態様において、上記表皮中のMCP2の発現の亢進は、表皮中のMCP2の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記測定はMCP2に特異的な抗体を利用するELISA法又はRIA法による。

さらに好適な態様において、上記表皮中のMCP2の発現の亢進は、表皮から抽出されたMCP2をコードするmRNAの量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行う。

【0009】

第二の観点において、本発明は皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、候補化合物をMCP2の発現及び／又は活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するMCP2インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、この方法はさらに、上記阻害能力を有するMCP2インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

【0010】

第三の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド(ヒトFLJ21763遺伝子)もしくはその中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドの発現、又は表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド(ヒトFLJ21763遺伝子)、配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド(マウスAK012157遺伝子)もしくは配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド(ラットS74257遺伝子)もしくはそれらの中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドに対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする。ヒトFLJ21763遺伝子及びラットS74257遺伝子はマウスAK012157遺伝子に対し高い相同性を示す遺伝子である(それぞれ約70%及び約80%)。マウスAK012157遺伝子、ヒトFLJ21763遺伝子及びラットS74257遺伝子の対比を図1~2に示す。ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ.SambrookらMolecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10~40mM、好ましくは約20mM、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃であることを含む条件をいう。

好適な態様において、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とする。

さらに好適な態様において、上記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進は、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行う。

【0011】

第四の観点において、本発明は皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、候補化合物を表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）もしくはその中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドの発現、又は表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）、配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（マウスAK012157遺伝子）もしくは配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラットS74257遺伝子）もしくはそれらの中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドに対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、この方法は更に、上記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法提供が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

上述の通り、マウスAK012157遺伝子あるいはこの遺伝子に対し高い相同性を示すラットS74257遺伝子やヒトFLJ21763遺伝子は）に関し皮膚色素関連の報告は存在しない。また、マウス及びヒトMCP-2も皮膚色素関連の報告は存在しない。本発明者は紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮においてAK012157遺伝子及びMCP-2遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。特に、これら遺伝子の発現の亢進はしみモデルマウスにおいてUV照射期にとどまらず、UV照射を終えた後にUV照射による表皮の褐色が脱色し始める脱色期、更にはその後しみが出現し始め、しみが形成される色素斑形成期においても認められた。しみモデルマウスの表皮においてこれらの遺伝子の発現が脱色期においても亢進していることから、ヒトにおいても、これら遺伝子と相同な遺伝子を指標とすれば、しみが形成される前の脱色期においても将来しみが形成されることを予知できることとなる。

【0014】

しみモデルマウス

しみモデルマウスはM. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製することができる。簡単には、例えば7週齢前後のマウスに紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で約8週にわたり週約3回、99mJ/cm²程度の強度で紫外線照射する（UV照射期）。かかるUV照射期の間、皮膚の均一な色素沈着（皮膚の褐色化）が認められるようになる。この色素沈着はUV照射を止めてから2週間程度ではほぼ完全に消失する（脱色期）。その後、直径約2mm以下の小さい、薄茶色の色素斑（いわゆる老人性色素斑様の「しみ」）が出現しはじめる（色素斑出現及び形成期）。

【0015】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法

本発明は、皮膚、好ましくはヒト皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMCP-2遺伝子もしくはヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することの特徴とする。その評価基準として、例えば表皮中のMCP-2遺伝子もしくはヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現がコントロール表皮中のそれらと比べ10%以上、又は20%以上、又は30%以上、又は50%以上、又は70%以上、又は100%以上亢進していたなら「しみ形成のし易い皮膚である」と判断する、としてよい。検査すべき皮膚は、例えば顔、首、腕、肢など、しみができやすく、またしみ形成の気になるあらゆる部分の表皮であってよい。しみ形成のしない正常表皮、即ちコントロール表皮としては、例えば同一個体の例えば紫外線に曝されにくく、比較的しみのできにくい部位の表皮、例えば腹部、臀部の表皮であってよい。

【0016】

ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ. Sambrookら Molecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10～40 mM、好ましくは約20 mM、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃であることを含む条件をいう。

【0017】

表皮中のMCP-2発現の亢進は、例えば表皮中のMCP-2の量を測定することにより決定される。好ましくは、この測定はヒトMCP-2に特異的な抗体を利用し、当業界において周知の方法、例えば蛍光物質、色素、酵素等を利用する免疫染色法、ウェスタンブロット法、免疫測定方法、例えばELISA法、RIA法等、様々な方法により実施できる。また、表皮からRNAを抽出し、ヒトMCP-2をコードするmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

【0018】

表皮中のヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現は、表皮からRNAを抽出し、上記ポリヌクレオチドに対応するmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

【0019】

上述の通り、本発明は、紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮においてAK012157遺伝子及びMCP-2遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出したことに基づく。従って、表皮中のMCP-2遺伝子の発現及び／もしくはMCP-2の活性を抑える、表皮中のヒトFLJ21763遺伝子の発現を抑える、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を抑えることを指標とした皮膚のしみ形成を抑える及び／又は形成されたしみを除去する薬剤を開発することができるものと推認される。

【0020】

従って、本発明は上記遺伝子の発現を阻害するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として含んで成る医薬又は皮膚外用組成物を提供する。本発明

に係る組成物は皮膚のしみ形成を予防又はしみを除去することができる。

【0021】

MCP-2の活性を阻害するインヒビターとしては、例えば特表2001-51829 6号公報に記載されている天然MCP-2のアミノ酸1、1~2、1~3、1~4又は1~5に相当するNH₂-末端アミノ酸を欠き、ケモカインアンタゴニスト活性を有するアミノ末端切除型MCP-2が挙げられる。

【0022】

また、MCP-2のインヒビターには、MCP-2が結合することで知られるCCR-1、3又は5レセプターのアンタゴニストが含まれる。CCR-3レセプターのアンタゴニストは例えば特開平11-14782号公報、特表2002-512957号公報、特表2002-512960号公報、特表2002-530374号公報、特表2002-512957号公報、2003-510248号公報に記載されている。その具体例としては、例えば、

N- {1- (S) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペラジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N- {1- (S) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペラジン-1-イルメチル] -2, 2-ジメチルプロピル} -4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N- {1- (S) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペリジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N- {1- (R) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペリジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -4- (2-アミノエチル) ベンズアミド二塩酸塩；

N- {1- (R) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペリジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -5-メチルチオフエン-2-カルボキサミド塩酸塩；

1- {1- (R) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペラジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -3- (3-メトキシフェニル) 尿素；

1- {1- (R) - [4- (3, 4-ジクロロベンジル) ピペリジン-1-イルメチル] -2-メチルプロピル} -3- (3-メトキシフェニル) 尿素；

(S)-エチル-2-(4-メチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

【0023】

(S)-エチル-2-(ナフタレン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；(S)-エチル-2-(チオフエン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(キノリン-8-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-プロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-クロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-メタンスルホニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-[2-(E)-スチリルスルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-トリフルオロメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキ

シフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフエン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-プロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-[5-(2-ピリジル)チオフエン-2-スルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

【0024】

(S)-エチル-2-(1,3-ジメチル-5-クロロ-2-ピラゾリン-4-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-ビフェニルスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,4-ジフルオロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,4-ジフルオロベンゼンスルホニルオキシフェニル)]プロピオネート;

(S)-エチル-2-(5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(チオフエン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,4,6-トリメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-プロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-クロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-[2-(E)-スチリルスルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

【0025】

(S)-エチル-2-(3-トリフルオロメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフエン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-プロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-[5-(2-ピリジル)チオフエン-2-スルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフエン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-プロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロ

ベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート;

(S)-イソプロピル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート;

(S)-メチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート;

(S)-ベンジル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-クロロフェニル)プロピオネート;

【0026】

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S,S)-エチル-2-(2-ベンジルオキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S,S)-エチル-2-(N-アセチルピロリジン-2-ベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-シクロヘキサニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(3,3-ジフェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(3-フェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-[2-(2-ナフチル)アセチルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-フェニルブチリルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ペンタニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ペンタニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(4-ベンゾイルベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-フラニル)アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(5-ヒドロキシインドニル)アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

【0027】

(S)-エチル-2-ピペロニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ピコリニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(3-ニトロ-4-クロロベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(3-ヒドロキシ-4-ニトロベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-(8-キノリニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-フェニルプロピオネート;

(S)-メチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-ベンジル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-メトキシフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-tert-ブチルオキシカルボニルアミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-tert-ブチルオキシカルボニルアミノ-3-(4-アミノフェニル)プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェニル)プロ

ピオネート;

(S)-エチル-2-カルボキシベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(1-ナフチル) プロピオネート;

(±)-エチル-2-ベンゾリルアミノ-3-[3-(ベンゾイルオキシ)フェニル] プロピオネート;

(±)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

【0028】

(R, S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(2-ヒドロキシルフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-アミノフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-(2-フェニルアセチルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-インドイル) プロピオネート;

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-2-フェニルアセタート;

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-4-フェニルブチラート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-シクロヘキサニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-ベンジル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-メトキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(1-ナフチル) プロピオネート;

(±)-エチル-2-ベンゾリルアミノ-3-[3-(ベンゾイルオキシ)フェニル] プロピオネート;

(±)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(R, S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(2-ヒドロキシルフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル) プロピオネート;

【0029】

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-2-フェニルアセタート;

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-4-フェニルブチラート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネート;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル) プロピオネートが挙げられる。

【0030】

CCR-1 レセプターのアンタゴニストには、例えば特許出願公開 WO 97/24325; P f i z e r, I n c. による WO 98/38167; 帝人 (株) による WO 97/44329; 萬有製薬 (株) による WO 98/04554; M e r c k & C o., I n c. による WO 98/27815、WO 98/25604、WO 98/25605、WO 98/25617 及び WO 98/31364; L e u k o S i t e, I n c. による WO 98/02151 及び同 WO 99/37617; L e u k o S i t e, I n c. らによる WO 99/37651 及び WO 99/37619; 米国特許仮出願第 60/021, 716 号明細書 (1996 年 7 月 12 日出願); 米国特許出願第 09/146, 827 号明細書 及び同第 09/148, 236 号明細書 (1998 年 9 月 4 日出願); H e s s e l g e

sserら、J. Biol. Chem. 273 (25) : 15687~15692 (1998) ; 及びHowardら、J. Medicinal Chem. 41 (13) : 2184~2193 (1998) に記載の化合物が挙げられる。

また、CCR-5レセプターのアンタゴニストには、例えば特表2002-543186公報に記載のものが挙げられる。

【0031】

本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、例えば水溶液、油液、その他の溶液、乳液、クリーム、ゲル、懸濁液、マイクロカプセル、粉末、顆粒、カプセル、固形剤等の形態で適用される。従来から公知の方法でこれらの形態に調製したうえで、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤、水-油2層系、水-油-粉末3層系、注射剤、内服剤（錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等）、坐剤等として、身体に塗布、貼付、噴霧、注射、飲用、挿入することができる。当該組成物は上記インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として、特に限定することなく、組成物全量に基づき例えば0.001mM~1M、好ましくは0.01~100mM、より好ましくは0.1~10mM程度含有するであろう。

【0032】

これらの剤型の中でも、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤等の皮膚外用剤が、本発明の目的に適する剤型である。なお、ここで記す皮膚外用剤には、医薬品、医薬部外品（軟膏剤等）、化粧品〔洗顔料、乳液、クリーム、ジェル、エッセンス（美容液）、パック・マスク等の基礎化粧品；ファンデーション、口紅等のメーキャップ化粧品；口腔化粧品、芳香化粧品、毛髪化粧品、ボディ化粧品等〕が含まれる。特に本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、しみ予防の化粧品としての適用が好適である。

【0033】

本発明の医薬又は皮膚外用組成物においては、所望する剤型に応じて従来公知の賦形剤や香料等をはじめ、油脂類、界面活性剤、防腐剤、金属イオン封鎖剤、水溶性高分子、増粘剤、顔料等の粉末成分、紫外線防御剤、保湿剤、酸化防止剤、pH調整剤、洗浄剤、乾燥剤、乳化剤等が適宜配合される。さらにこの他の薬効成分を本発明の医薬又は皮膚外用組成物に配合することは、その配合により所期の効果を損なわない範囲内で可能である。

【0034】

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法

本発明はさらに、皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法も提供する。この方法は、候補化合物を表皮中のMCP-2の発現及び／もしくは活性を抑える、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAKO12157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジент条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を抑える能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、上記スクリーニング方法は更に、上記阻害能力を有するインヒビターをしみモデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

【0035】

上記インヒビターの皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果についての確認する工程はこのインヒビターをしみモデル動物、例えばしみモデルマウスを利用して実施することができる。動物としてはマウスの他にラット、ウサギなど様々な動物が利用できる。好適な態様においては、このインヒビターの溶液、例えば水溶液を調製してから皮膚しみモデル動物の皮膚に繰り返し塗布し、しみの形成を評価することで、上記効果の有無を判定することができる。

【0036】

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限

定されるものではない。

【実施例】

【0037】

しみモデルマウスの作製

しみモデルマウスはM. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製した。簡単には、7週齢のマウスに紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で8週にわたり週3回、99mJ/cm²の強度で紫外線照射した(UV照射期)。週齢15~23週(UV照射期が終了して約8週まで)の間に脱色期を迎え、週齢23~35週(UV照射期が終了して約18~30週後)の間に色素斑出現期を迎え、週齢35~52週(UV照射期が終了して約30~47週後)の間に色素斑形成期を迎えた。

【0038】

皮膚からのRNA採取

マウス背部の皮膚全層を採取、脂肪層を取り除き、加熱により表皮を剥離し、表皮をISOGEN(日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル)によりRNAを抽出、RNeasy(Qiagen社)により精製した。真皮の方は、1センチ角に切断して液体窒素で凍結し破碎後、ISOGEN(日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル)によりRNAを抽出、RNeasy(Qiagen社)により精製した。RNAはTBEアガロースゲルで泳動し、SYBR green(Molecular probes社)で染色して品質、精製度を確認した。

【0039】

UV照射期の試料は週齢約10週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールは週齢約14週目のマウスから採取した。脱色期の試料は週齢約20週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールも週齢約20週目のマウスから採取した。色素斑形成期の試料は週齢約42週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールは週齢約40週目のマウスから採取した。

【0040】

マイクロアレイ用サンプルの反応

マイクロアレイ解析はアフィメトリックス社ジーンチップを用いた。

アフィメトリックス社用サンプル調製

アフィメトリックス社推奨プロトコルに準じて反応を行った。RNA 10μgをoligo-dTプライマー(24mer)、100pmol(Sigma社)と共に70℃で10分間反応させた。その後、5x第一鎖反応バッファー4μl、0.1M DTT 2μl、10mM dNTP ミックス1μl, Superscript II 2μl(すべてInvitrogen社)を加えて、42℃で1時間反応させた。この反応物に、Rnase非含有水91μl、5x第二鎖反応バッファー30μl、10mM dNTP ミックス3μl、10U/μl E.coli DNA リガーゼ1μl、10U/μl E.coli DNAポリメラーゼI 4μl、2U/μl Rnase H 1μl(すべてInvitrogen社)を加え、16℃で2時間反応させた。さらに、2μl(10U/μl)のT4 DNA ポリメラーゼ(Invitrogen社)を加え、16℃で5分間反応後、10μlの0.5M EDTAを加えて反応を止めた。Phase Lock Gels(Qiagen社)を用いクリーンアップを行い、Rnase非含有水12μlに溶出した。得られたcDNAからin vitro 転写反応によりビオチン付加cRNAを作製し(Enzo, Farmingdale)、RNeasy(Qiagen社)により精製した。cRNAをフラグメンテーションバッファー中で94℃にて35分間分断した後、ジーンチップハイブリダイゼーションに用いた。チップ洗浄後、アフィメトリックス社スキャナーによりデータ読み取りを行った。

【0041】

解析結果

約9,000種の遺伝子の発現を網羅的に解析した結果、しみモデルマウスの表皮において、コントロールマウスの表皮と比べ、AKO12157遺伝子及びMCP-2遺伝子の発現が顕著に亢進されていることが見出された。興味深いことに、これら遺伝子の発現の亢進はUV照射期にとどまらず、UV照射を終えることでUV照射による表皮の褐色が脱色し始める脱色期、更にはその後しみが出現し始め、しみが形成される色素斑形成期においても常に認められた。しみモデルマウスの表皮においてこれらの遺伝子の発現がしみができる前

の脱色期においても亢進していることから、これら遺伝子を指標とすれば、しみが形成される前の脱色期においても将来しみが形成されることを予知できることとなる。以下の表にその結果を示す。

【0042】

【表1】

各コントロールに対する変動率

	UV照射期	脱色期	色素斑形成期
MCP-2	4.7	13.8	3.2
AK012157	5.3	5.5	6.4

(正常部位またはUV非照射部位を1としたときの発現比。
UV照射期、脱色期はn=2、色素斑形成期はn=3の平均値。)

【0043】

RT-PCR

皮膚から採取したRNA各(シミ部位、非シミ部位の表皮又は真皮) 1 μ gをオリゴ-dTプライマー(24mer) 100pmol (Sigma) と共に70℃で10分(総容量20 μ l)反応させた。その後、5x第一鎖反応バッファ 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, 2.5mM dNTP ミックス 4 μ l, SuperscriptII 1 μ l (すべてinvitrogen) を加えて、42℃で1時間反応させた。最後に70℃で10分反応させて伸長させ、cDNAテンプレートを調製した。rTaq用10xバッファ 5 μ l, 25mM MgCl₂ 3 μ l, 2.0mM dNTP ミックス 5 μ l, rTaq 0.5 μ l (すべてTOYOBO社), ddH₂O 33.5 μ l, cDNAテンプレート各1 μ l、プライマー(下記配列参照)、センス及びアンチセンス各20mM 1 μ l (総容量50 μ l) をすべて加え、PCR反応[94℃ 2分、(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分) を30サイクル、72℃ 10分]を行った。

【0044】

MCP-2 プライマー配列

センス TTCTTTGCCTGCTGCTCATA (配列番号4)

アンチセンス GACAAGGATGAGAAAACACG (配列番号5)

AK012157 プライマー配列

センス ACTCCGGCTCCTTCACTATG (配列番号6)

アンチセンス CTTTGGAATGAGGACTTGA (配列番号7)

【0045】

最後に1.5%エチジウムブロマイド含有アガロースゲルにて電気泳動して約300bpのバンドを得た。この結果を図3に示す。図3から明らかとなおり、AK012157遺伝子及びMCP-2遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。また、真皮においてはいずれも発現差がなかった。

【0046】

in situ ハイブリダイゼーション (ISH)

マウス皮膚組織を10%中性ホルマリンで固定、パラフィン包埋後、常法にしたがって組織切片スライドを作成した。これをベンタナ社HXシステム自動スライド処理機を使用してin situ ハイブリダイゼーション反応を行った(プロトコール: Japan open blue 8.0)。前処理として組織切片をブロッキング、プロテアーゼ処理後、AK012157配列からT7ポリメ

ラーゼを用いて作成したDigラベルリボプローブ500ngと、68℃にて6時間ハイブリダイゼーションさせた。その後洗浄してAnti-Dig-アルカリフォスファターゼを反応させ洗浄後、基質NBT/BCIPを用いて呈色させて封入、光学顕微鏡で観察した。

その結果を図4に示す。図4から明らかなとおり、AK012157遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。

【0047】

免疫組織染色 (IHC)

マウス皮膚組織を中性ホルマリン固定、パラフィン包埋後、常法に従って組織切片を作成した。これを1% H_2O_2 で15分処理後、30分ブロッキングし、1/50希釈の抗マウスMCP2抗体(R&D Systems)を1昼夜反応させた。これをチラミド増感法(TSAシステム、パーキンエルマー社)キットによって検出を行った。洗浄後、HRPつき二次抗体を反応させ洗浄、FITCラベルチラミドを反応させて洗浄、包埋し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

【0048】

その結果を図5に示す。図5から明らかなとおり、MCP-2遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】 マウスAK012157遺伝子、ヒトFLJ21763遺伝子及びラットS74257遺伝子の対比。

【図2】 図1の続き。

【図3】 PCRによる、しみモデルマウスの表皮及び真皮におけるAK012157遺伝子及びMCP-2遺伝子の発現を示す。

【図4】 in situ ハイブリダイゼーションによる、しみモデルマウスの表皮におけるAK012157遺伝子の発現を示す。

【図5】 免疫組織染色による、しみモデルマウスの表皮におけるMCP-2の発現を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shiseido Co. Ltd.

<120> Methods for Predicting Skin Stain Formation and for Screening Agent Capable of Inhibiting Skin Stain Formation By Means of Promoted Genes in Stained Regions as an Indicator

<130> 1033906

<160> 3

<210> 1

<211> 758

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 1

```

aaacnntttt cgtggcacag cttcctccct aggcgtagaga ctccggctcc ttcactatga      60
gacttctagc cctttccggt ctgctctgca tgctgctcct ctgtttctgc attttctcct      120
cagaagggag aagacatcct gccaaagtcct tgaaactcag gcgctgctgt cacctatctc      180
ctagatccaa gctgacaacc tggaaaggaa accacacaag gccctgcaga ctctgcagaa      240
acaagctacc agtcaagtca tgggtgggtgc ctggggctct cccacagata tagggcctcc      300
tccgccaga tgaagcgttg atgccagat gtggagacac cagaagcata cacactatgt      360
tgccttgccc cttgccaatg agctgtgaca ctggaatgct tcacttcaga catcaggcg      420
gatggattgc agaattccaa gtcctcattc caaagggtgc accaaccttc agagtcacta      480
aggtccaggc tcagcccaca agtcacatg gtcctccag agtaaaagtc caagattcca      540
cctgtgggag ctacagatcc agagactttc aagctgacta gagtgcagag aagcaagacc      600
tcagtgtgat cagccgagac tacagcatct tgggaaccct cagtcagccc caaacccta      660
acacttaacc actggtctcc aaaccaacac ctgtaacttc ctaatgaaat catcaggagg      720
atacaaaaag aaataaacca taaatcagca tacacag      758

```

<210> 2

<211> 2063

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

ctctgcccac tgggaaacac ctctctatga ctctataaat gtccaagggtg gcccgaaggg      60
aggacttctg cagcacagct cccttccag gacgtgaaaa tctgccttct caccatgagg      120
cttctagtcc tttccagcct gctctgtatc ctgcttctct gcttctccat cttctccaca      180
gaagggaaga ggcgtcctgc caaggcctgg tcaggcagga gaaccaggct ctgctgccac      240
cgagtccta gcccgaactc aacaaacctg aaaggacatc atgtgaggct ctgtaaacca      300
tgcaagcttg agccagagcc ccgcctttgg gtggtgcctg gggcactccc acagggtgtg      360
cactcccaaa gcaagactcc agacagcgga gaacctcatg cctggcacct gaggtacca      420
gcagcctcct gtctccctt tcagccttca cagcagttag ctgcaatgtt ggagggtctc      480
atctcgggct gcaaggacct tgggaaagt ccagaactcc acgtccttgt ctcaattgtg      540
ccatcaactt tcagagctat catgagccaa cctcagcctt ccgagtagct gggattacag      600
gtgtgcgcca ccacaccgg ctaatttttg ctttttttt ttttgagaca gaatctcgct      660
ctgttgctca ggctggagtg gagtgcagtg gcacgatctc agctcactgc agcctctgcc      720
tcccgggttc aggagattct cctgactcaa cctcctgagt agctgggatt acagggtgct      780
gccactatgc ctgactaatt tttgtatttt tagtggagac ggggttttgc cgtgttggcc      840
ggggtggtct cgaactcctg acctcaagt atccaccgc atcgccccc caaagtgtg      900
ggattatagg cgtgaaccac cgcgctgtc ccattgttgt gtaattttta taattagttt      960
tttaagtact tgattttatg ggcacatttt tgtgggatga ttggagttaa tcaaataaag      1020
cttgtcatgt gtgtagtttg gtaagataac ttctttaaat tcatgttttc tctgccttga      1080

```

ggtagtgagg gaaagatctt aatcagtatt ttggtaatta actgattgaa ttcaagcaaa 1140
 tgagacatca tgaacttcag tggttattga tatitcaggg tatatacctg aaatgcctag 1200
 aggatacaga tttctcatit catttcttgg tctttcatit ctctatatac agaaatgaaa 1260
 tgacacttct gggaggcagt agaagcagga agtcaatgaa ttgagtagag ggtcccatc 1320
 cctcaggctg tcattgatca gtgacaattt ataaaaacaa actgcaaagt ctgtggcaag 1380
 tggctgcctg cticctagaa ggagcccatg aagggttaaac tctgtggctg gtatttgcaa 1440
 gcgccgggcg tggtaggtca cgcctgtaat cctagcacct tgggaggcca aggcaggcgg 1500
 atcacccgag gtcaggagtt tgaggatttg caagcaaaag gtcctctcct gagtctttcc 1560
 cagataccca gcagtgcaga ggctagctgt ggaagggttg agtgggacag gaatgtattg 1620
 tatgccttgc ctacttgc accattgaga ttccagaga aatgggcata acgtctctta 1680
 acaacaacag cagaaagcaa aatacattaa cttaagggtg acaacaaaag attatcaagt 1740
 accatgtttt ccaaccaacc agttattcgt ggtaataata aaataaagggt gggaaaatgt 1800
 tataattttt aaggaaactg tgtactttaa aaatcttctt tatgaatc caatgttact 1860
 gtaatcctgc tccattaaat gcagcattgt tgtcagggtgc tgctcttgc ttgggaacag 1920
 cattgggctt ttaaatgtct gcagaatctc tgcgttcgaa gggaattgag aatgaacttc 1980
 ctggtactgt aatgaaaata aggtctgctc aacacagtaa acgtttcctc tcttctttaa 2040
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2063

<210> 3

<211> 742

<212> DNA

<213> Rat

<400> 3

tttttttgtg ccaactgctt ctctctagcc gtgagactcc agctacttca ctatgcgact 60
 tctcaccctc tccggtttgt tcttcatgct gttcctctgt ctctgcgttc tctcctcaga 120
 agggagaaaag cgtcctgcca agttcccga actcaggcct gctgtcatct atctcctaga 180
 tccaaaccaa taactggaaa ggaaaccaca caagaccctg cagaccatgc agaaagctag 240
 aatccaattc atgggggtgt gcctggggct ctcccacaga tatagggcct cccgaagctg 300
 gcctccaccg agatgaaacg ttgatgtcca gttatggaga caaccttctg gccctacca 360
 accttcatgg ccagaaagct gtgacaccag aatgtttcac ttcagacagc tgaaggatta 420
 cagaattcca agccctcgtt ccaaagggtgc aaccaacctt cagagtcact atgatccagg 480
 gtcagcccac aagtcttcat ggctcctgca gagtaaaagt ccaagattcc atccctggga 540
 gctacagatt cagagacttc caagctgact ggcgaaacaga gtagcaagac ttccttgtga 600
 tcagatgaga ttacagcatc ttaggaaccc tcggacaccc ccaaaccat agcatttaat 660
 caacgggata tgaaccaact cctgtaactt cctaattgaa tcaccaggag aacacaaaaa 720
 ataataaatc ataatcaat gt 742

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Sense Primer

<400> 4

ttctttgcct gctgctcata

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Antisense Primer

<400> 5
gacaaggatg agaaaacacg 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Sense Primer
<400> 6
actccggctc cttcactatg 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Antisense Primer
<400> 7
ctttggaatg aggacttgga 20

【書類名】 図面
【図 1】

図 1

Start

AK012157	1'	AAACCN	TTTTCTG	TGGC	CAGCTT	CCTCC	CTAGG	-CGT	GAGACT	CCGG	CTCCT	CACT	TATGA
S74257	1"	TTTTTT	GTGCC	ACTG	CTTCT	CTAGC	-CGT	GAGACT	CCAG	CTACT	TCACT	ATGC	
FLJ21763	1"	GGAGG	ACTTCT	GCAG	CACAG	CTCC	CTTCC	CAGG	ACGT	GAAAA	TCTGC	CTTC	-TCACCATGA
		**		***	***	***	**	*	***	*	*	***	***
AK012157	61'	GACTT	CTAGC	CCCTTT	CCGGT	CTGCT	CTGC	ATGCT	GCTC	CTGTT	CTGC	ATTTT	CTCCT
S74257	57"	GACTT	CTCACC	CTCTCC	GGTTT	GTTCTT	CATG	CTGTT	CCTCT	GTCT	CTGCT	CTCCT	
FLJ21763	120"	GGCTT	CTAGT	CCTTT	CCAGC	CTGCT	CTGT	ATCCT	GCTT	CTCT	GCTT	CTCAT	CTTCTCCA
		*	*****	***	***	*	*	***	***	***	***	*	*****
			intron start										
AK012157	121'	CAGA	AGGG	GAGA	AGAC	ATCCT	GCCA	AGTC	CTTG	AAACT	CA-----	GGCG	GCTGTCA
S74257	117"	CAGA	AGGG	GAGAA	AGCGT	CCTG	CCA	AGTT	CCG	AAACT	CA-----	GGCC	GCTGTCA
FLJ21763	180"	CAGA	AGGG	AAGAG	GGCGT	CCTG	CCA	AGGC	TGGT	CAGG	CAGG	AACCA	GGCTCTGCTGCCA
		*****	*	*	*****	*	*	*	*	*	*****	*****	*****
			intron start										
AK012157	181'	CCTAT	CTCCT	AGAT	CCA	AGCT	GACA	ACCT	GGAA	AGGAA	ACCAC	ACA	AGGCCCTGCAGACT
S74257	176"	TCTAT	CTCCT	AGAT	CCA	AACT	AACT	CTGG	AAAGG	AAACC	ACACA	AGACC	CTGCAGACC
FLJ21763	240"	CCGAG	TCCCT	AGCCCC	AACT	CAACA	AACT	GAA	AGG	ACAT	CATGT	GAGG	CTGTAAACC
		*	*	*****	*****	*	*	*	*****	*	*	*****	*****
			stop										
			*										
AK012157	241'	CTGC	AGAA	ACA	AGCT	ACC	AGT	CA	AGT	CAT	-GGG	TGGT	GCCTGGGGCTCTCCACAGATAT
S74257	235"	ATGC	AGAAA	-GCT	AGA	ATCCA	ATT	CAT	-GGG	TGGT	GCCTGGGGCTCTCCACAGATAT		
FLJ21763	300"	ATGC	AAGCTT	GAGCC	-AG	AGCCCC	GCCTTT	GGG	TGGT	GCCTGGGG	CACTCC	ACAG	GTGT
		****		**	*	*	*	*	*****	*****	*****	*	*
		**											
AK012157	299'	AGGG	CCCT-----	CCT	CGCC	CAGA-----	TGA	-AGC	GTG-----	ATG	CCC	AG-	
S74257	292"	AGGG	CCCTCCCG	AAGCT	TGGC	CTCACC	GAGA-----	TGA	-AAC	GTG-----	ATG	TCC	AG-
FLJ21763	359"	AG	-CACT-----	CCCA	AAGCA	AGACT	CCAG	ACAG	CGG	AGAAC	CTCAT	GCCT	GCG
		**	**		**	*	***	---	**	-*	**	*	---

【図 2】

図 2

AK012157 349' ATGTGGAGACACCAGAAGCATACACACTATGTTGCCCTTGCCCTTGCCAATGAGCTGTGA
S74257 349" TTATGGAGACA--ACCTTC-TGGCCCTA-CCAACCTT---CATGGCCAGAAAGCTGTGA
FLJ21763 418" ACCTGAGGTACCCAGCAGCCTCCTGTCTCCCTTTAGCCTTCACAGCAGTGAGCTGCAA
* * * * *

AK012157 409' CACTGGAATGCTTCACCTTCAGACATC-AGGGCGGATGG---ATTGCAGAATCCAAGTCCTCATTCCAAAG
S74257 409" CACCAGAATGTTTCACCTTCAGAC---AGCTGGAAGG---ATTACAGAATCCAAGCCCTCGTTCCAAAG
FLJ21763 478" TGTTGGAGGGCTTCATCTCGGGCTGCAAGGACCCTGGGAAAGTTCCAGAACTCCACGTCTTGTCTCAATT
* * * * *

AK012157 469' GTGTCAACCAACCTTCAGAGTCAGTAAAGGTCCAGGCTCAGCC-CACAAGTCACCATGGCTC
S74257 460" GTGCAACCAACCTTCAGAGTCAGTATGATCCAGGGTCAGCC-CACAAGTCTTCATGGCTC
FLJ21763 538" GTGCCATCACTTTTCAGAGCTATCATGAGCCAACCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGATTA
* * * * *

AK012157 529' CTCAGAGTAAAAGTCCAAGATTCCACCTGTGGGAGCTACAGATCCAGAGACTTTCAAGC
S74257 520" CTCAGAGTAAAAGTCCAAGATTCCATCCCTGGGAGCTACAGATTCCAGAGACTTCAAGC
FLJ21763 598" CAGGTGTGCGCCACCACCCGGCTAATTTTTGCTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAATCTC
* * * * *

AK012157 589' TGA CTAGAGTGCAGAGAAG-CAAGACCTCAGTGTGATCAGCCGAGACTACAGCATCTTGG
S74257 580" TGA CTGGCGAACAGAGTAG-CAAGACTTCCTTGTGATCAGATGAGATTACAGCATCTTAG
FLJ21763 658" GCTCTGTTGCTCAGGCTGGAGTGGAGTGCAGTGGCAGATCTCAGCTCACTGCAGCCTCT
* * * * *

AK012157 649' GAACCCCTCAGTCAGCCCCAAACCCCTAACACTTAACCACTGGTCTCCAAACCAACACCTG
S74257 640" GAACCCCTCGGACACCCCAACCCATAGCATTTAATCAACGGGATATGAACCAACTCCTG
FLJ21763 718" G---CCTCCCGGGTTTCAGGAGATTCTCCTGACTCAACCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGG
* * * * *

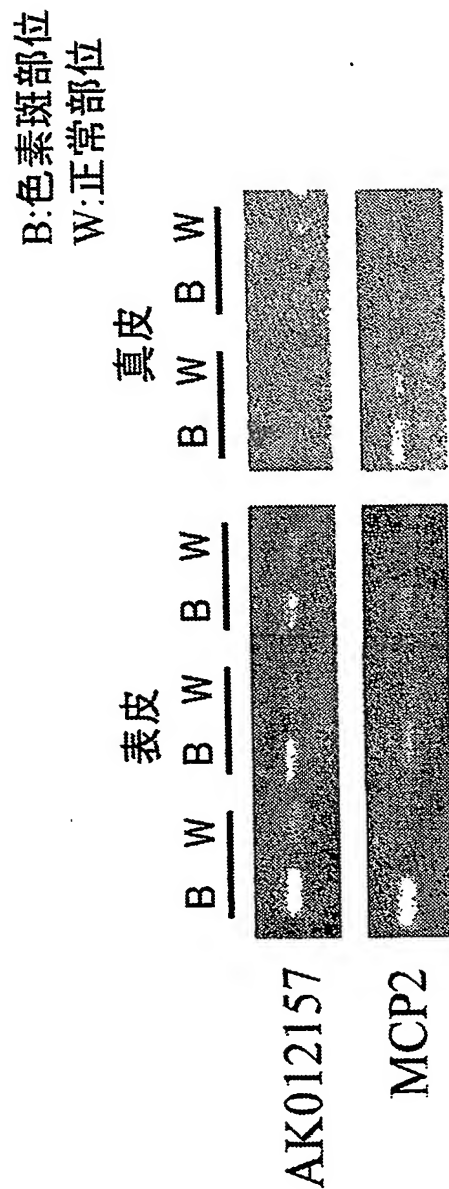
AK012157 709' TAACTTCCTAATGAAATCATCAGGAGGATACCAAAAGAAATAAACCATAAATCAGCATACACAG
S74257 700" TAACTTCCTAATGTAATCACCAGGAGAACACCAAAATAATAAATCATAAATCAATGT
FLJ21763 776" TGCCTGCCACTATGCCTAGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTGGAGACGGGGTTTTGCCGTGTTGGCC
* * * * *

GGGGTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCACCGCATCGGCCCCCAAG

【図 3】

図3

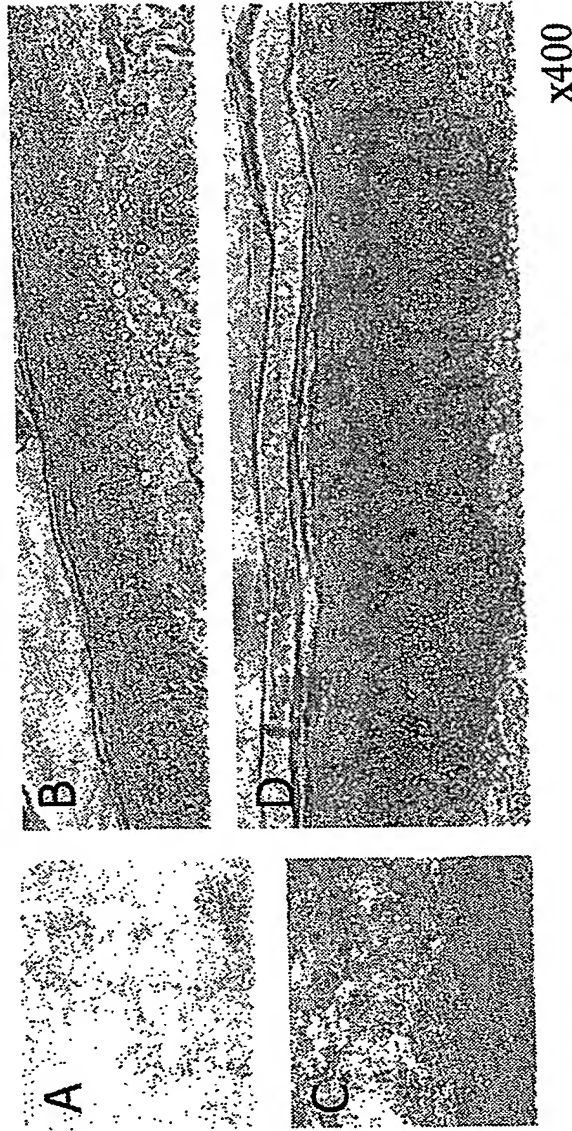
AK012157、MCP2のmRNA発現比較



AK012157については配列番号6,7、MCP2については配列番号4,5を用いて各組織より抽出したTotal RNAを用いてRT-PCRを行った結果(表皮n=3、真皮n=2)。表皮において両遺伝子とも、色素斑部位での発現が高い。

【図 4】

AK012157の表皮での発現様式 図4
(紫色: AK012157発現部位、茶色: メラニン)



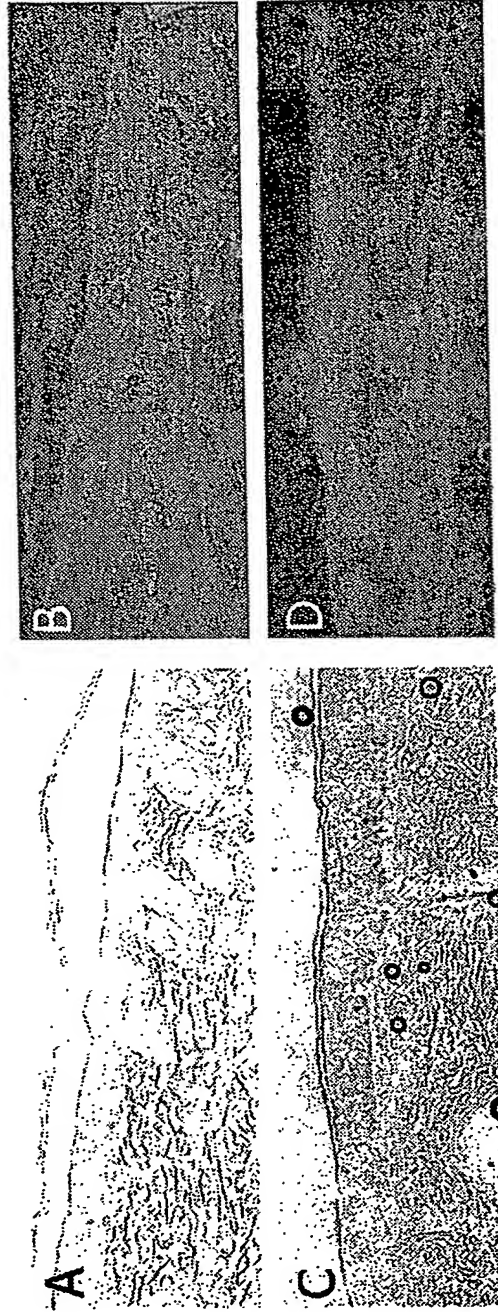
A: 正常部位皮膚外観図。
B: 正常部位AK012157染色像。発現はほとんどない。
C: 色素斑部位皮膚外観図。老人性色素斑様の色素沈着が見られる。
D: 色素斑部位AK012157染色像。発現が認められる。メラニンも見られる。

【図5】

図5

MCP2の表皮での発現様式

(緑蛍光:MCP-2発現部位)



- A: 正常部位透過光像。メラニンほとんどない。
 B: 正常部位MCP-2免疫染色像。発現はほとんどない。
 C: 色素斑部位透過光像。メラニンが認められる。
 D: 色素斑部位MCP-2免疫染色像。発現が認められる。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法の提供。

【解決手段】 本発明は、皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMCP-2遺伝子、又はマウスAK012157遺伝子、ヒトFLJ21763遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする。

【選択図】 図3



特願 2 0 0 3 - 3 4 3 5 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 9 5 9]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号
氏 名	株式会社資生堂

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.